

家蝇蛆抗菌肽提取工艺研究

陆婕* 钟雅* 柳林 付康 陈正望**

(华中科技大学生命科学与技术学院生物物理与生物化学研究所 武汉 430074)

摘要 : 蝇蛆抗菌肽多有广谱抗菌、抗癌等功能, 是很好的天然抗菌药物来源, 但由于得率较低, 目前对其产品开发的研究较少。以家蝇 *Musca domestica* 干蝇蛆为原料, 利用加热-层析法和海藻酸吸附法 2 种工艺提取蝇蛆抗菌肽。结果表明: 加热-层析法快速、简便, 抗菌肽提取得率达 0.26%, 是海藻酸吸附法提取抗菌肽得率的 5.2 倍。提取的家蝇抗菌肽主要是分子量 6.2 ~ 17.2 kD、等电点 5.59 ~ 5.91 的弱酸性小分子多肽, 其热稳定性高, 能杀灭枯草杆菌 *Bacillus subtilis* 等多种革兰氏阳性菌。加热-层析法能有效去除外源性蛋白酶, 保证肽类产品的稳定性, 同时还能提取出非蛋白类的抗菌成分, 提示其对开发具有高附加值的抗菌产品将会有良好的应用前景。

关键词 : 家蝇; 抗菌肽; 提取工艺; 资源利用; 抗菌产品

中图分类号: Q514.3 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)02-0106-07

Optimization of extraction technique for antibacterial peptides from *Musca domestica* larvae

LU Jie*, ZHONG Ya*, LIU Lin, FU Kang, CHEN Zheng-Wang** (Institute of Biophysical and Biochemistry, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract : It is not good enough to produce antibacterial peptides by genetic engineering because of much technology troubles involved and the mono-kind of peptide with narrow antimicrobial spectrum. It is very significant and valuable to isolate antibacterial peptides from abundant crude resource. Antibacterial peptides extracted from *Musca* larvae, which have multi-functions such as antibacterial and antitumor activities, are good natural medicine resources, but the product development research is few for the lower extracting ratio. Using natural material of dried *Musca domestica* larvae, by comparing the activities and characteristics of antibacterial peptides extracted by two methods such as heat-chromatography and alginic-acid-absorption, it had been proved that heat-chromatography was a quick, simple method with 0.26% peptides extracting ratio which was 5.2-fold to that of alginic-acid-absorption. The major antibacterial peptides extracted by heat-chromatography were determined having Mw 6.2 – 17.2 kD with Tricine-SDS-PAGE and pI 5.59 – 5.91 with IEF-PAGE. The peptides were very thermo-stable and had antibacterial activity against Gram-positive bacteria such as *Bacillus subtilis*. Besides maintaining the stability of bioactive peptides by removing the exotic proteases, the heat-chromatography could also extract non-peptides with antibacterial activity. This technique may be used to exploit the resource of houseflies sufficiently and develop the antibacterial products with high additional value supplying to medical treatment and health protection.

Key words : *Musca domestica*; antibacterial peptide; extraction technique; resource utilization; antibacterial product

利用基因工程方法生产抗菌肽除了工艺等问题 外, 还由于抗菌肽种类单一而效果欠佳。从来源丰

基金项目: 国家自然科学基金项目(30370647); 国家“863”计划项目(2002AA214061)

作者简介: 陆婕, 女, 1973 年生, 安徽人, 讲师, 博士, 主要从事生物活性肽的分离纯化和性质研究, E-mail: lujie_jane@163.com

* 陆婕和钟雅同为第一作者 Equal contributions were made by LU Jie and ZHONG Ya

** 通讯作者 Author for correspondence, Tel. & Fax: 86-27-87792027; E-mail: zwchen21@hotmail.com

收稿日期 Received: 2006-06-16; 接受日期 Accepted: 2006-09-21

富的天然材料中纯化抗菌肽很有应用前景。家蝇 *Musca domestica* 是我国大部分地区最常见、数量最多的一种蝇类。蝇蛆中存在抗菌肽、几丁糖、凝集素等大量抗菌、抗癌活性物质(贺继东和夏文水,2002;曹小红等,2003;宫霞等,2004;王明福等,2004;罗金香等,2005),即使在人工大规模高密度饲养条件下也不会发生集体染病,是很好的天然抗菌药物来源。提高蝇蛆抗菌肽的提取得率对大规模的生产制备非常重要。研究家蝇抗菌肽的纯化工艺对开发家蝇资源、生产抗菌产品有着重要的意义。国内学者探索了诱导家蝇抗菌肽产生的条件(周永富等,1997;王远程等,1997;饶军华等,1999;安春菊等,2003,2004;赵瑞君等,2005)以及各种分离纯化工艺(柏鸣和周立,2002;盛长忠等,2002;宫霞等,2003;刘晖等,2004;安春菊等,2005),但与规模化生产还存在一定距离。陆婕等(2006)根据家蝇抗菌肽主要是偏酸性小肽等性质,摸索了多种分离条件。现报道一种得率较高且适宜批量生产家蝇抗菌肽的提取工艺。

1 材料和方法

1.1 材料

供试蝇蛆:家蝇干蝇蛆即市售中药“五谷虫”,购于湖北省华城医药有限公司。

测试菌株:枯草杆菌 *Bacillus subtilis*、野生型金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由华中科技大学微生物实验室提供;苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 由华中农业大学生命科学与技术学院微生物实验室提供。

主要试剂:Sephadex G25 coarse、Sephadex G50 fine(Amersham),丙烯酰胺、双丙烯酰胺、载体两性电解质(pH 3.5~10)(Sigma),海藻酸(瑞典 Karolinska 学院赠送),标准蛋白分子量(Fermentas),家蝇抗菌肽 MD₇₀₉₅(本实验室分离纯化)。其他试剂均为进口分装分析纯。

主要仪器:层析系统(ÄKTA prime,Amersham,瑞典),微量蛋白质垂直电泳仪(Mini-PROTEAN 3Cell,Bio-rad,美国),冻干机(SNL 315SV Speed Vac,Savant,美国),高速冷冻离心机(GL21M,英泰,长沙)。

1.2 方法

1.2.1 蝇蛆抗菌肽酸提取液制备:参考陆婕等

(2006)方法,500 g 干蝇蛆用 0.5 mol/L 乙酸溶液(4.5 L)匀浆处理,4℃提取过夜,离心、过滤后得到 4 L 蝇蛆抗菌肽酸提取液。

1.2.2 蝇蛆抗菌肽提取的工艺流程:按图 1 所示流程将蝇蛆抗菌肽酸提取液以 2 种工艺进行提取,具体方法:(1)加热-层析法:将 2 L 蝇蛆抗菌肽酸提取液(相当于干蝇蛆原料 250 g)置 100℃水浴保温 50 min,4℃15 000 r/min 离心 40 min,收集沉淀,该热变性蛋白记为沉淀 A;将上清液冻干,得到干物质 B,按 1.2.3 节方法进行 Sephadex G25 coarse 柱脱盐-层析,B 不溶于 0.2 mol/L 乙酸的部分记为沉淀 B₀,根据洗脱曲线收集洗脱峰 B₁ 和 B₂;(2)海藻酸吸附法:将 2 L 蝇蛆抗菌肽酸提取液(相当于干蝇蛆原料 250 g)按陆婕等(2006)方法用海藻酸吸附提取,用布氏漏斗抽滤收集吸附了多肽的海藻酸后,将滤液直接冻干,得到干物质 D;海藻酸吸附的多肽进一步经洗脱、盐析得到干物质 C,按 1.2.3 节方法进行 Sephadex G50 fine 柱凝胶层析,C 不溶于 0.2 mol/L 乙酸的部分记为沉淀 C₀,根据洗脱曲线收集洗脱峰 C₁~C₁₁。

1.2.3 凝胶过滤:用 0.2 mol/L 乙酸充分平衡 Sephadex G25 coarse 柱(26 mm×1 000 mm)或 Sephadex G50 fine 柱(26 mm×1 000 mm),将样品溶于 15 mL 0.2 mol/L 乙酸,离心,收集沉淀并冻干;将上清液上样,用 0.2 mol/L 乙酸洗脱,流速 2 mL/min,280 nm 波长监测,根据洗脱曲线收集洗脱峰,冻干。

1.2.4 抗菌活力检测:各样品按微量液体检测法(陆婕等,2006)测定杀菌活性。

1.2.5 蛋白质电泳:分离小肽的 Tricine-SDS-PAGE 蛋白质电泳、等电聚焦电泳(IEF-PAGE),参照 Hermann 和 Gebhard(1987)、汪家政和范明(2002)以及陆婕等(2006)方法进行。分离胶浓度为 17%,每孔上样量 20 μg。

1.2.6 蛋白质分子量和等电点计算:参照 Hermann 和 Gebhard(1987)、汪家政和范明(2002)以及陆婕等(2006)方法计算。在分子量回归方程 $Y = aX + b$ 中, Y 为相应蛋白分子量的对数值($\lg Mw$), X 为蛋白迁移距离(mm);在等电点回归方程 $Y = aX + b$ 中, Y 为蛋白所在胶的 pH 值, X 为该蛋白迁移距离(mm)。回归计算得到相应的 a 、 b 值后,将待测蛋白的迁移距离值代入,即可计算得到该蛋白的分子量或等电点。

2 结果与分析

2.1 层析结果

按照图 1 所示流程用 2 种提取工艺提取蝇蛆抗菌物质。

利用加热-层析法收集的 B 物质溶于 0.2 mol/L 乙酸后 ,得到少量沉淀 B₀ ,上清液分别分 4 批上样

Sephadex G25 coarse 柱脱盐 ,收集各洗脱峰(图 2 : a)并冻干 ;组分 B₁ 呈淡黄色 ,质地蓬松 ,组分 B₂ 为深褐色 ,极易吸潮呈粘稠状。利用海藻酸吸附法提取的肽粗品 C 组分溶于 0.2 mol/L 乙酸后 ,得到少量沉淀 C₀ ,上清液经 Sephadex G50 fine 柱层析 ,按洗脱曲线收集得到 C₁ ~ C₁₁ 共 11 个组分(图 2 : b) ,未被海藻酸吸附的滤液取少量冻干得到组分 D。各主要组分的质量见图 1 中的标注。

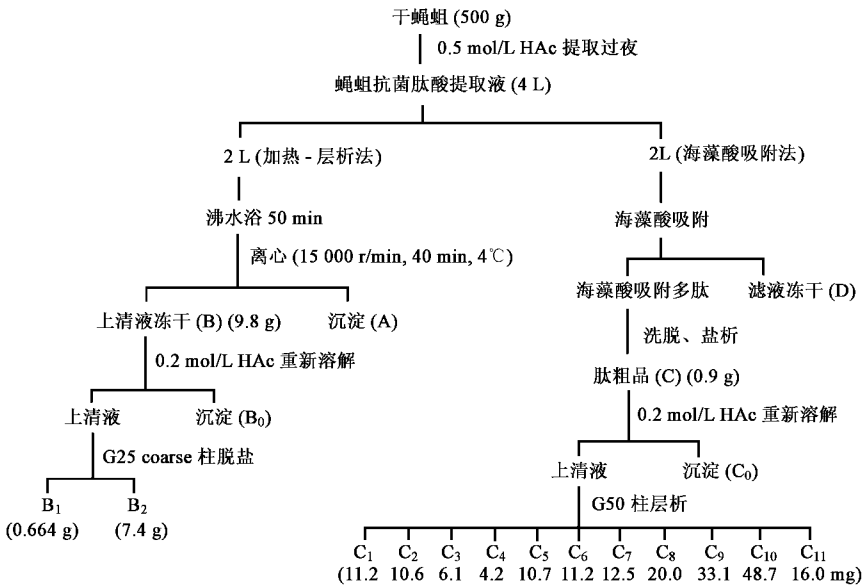


图 1 蝇蛆抗菌物质的提取工艺流程图

Fig. 1 Scheme of extraction process of antibacterial components from *Musca domestica* larvae

A : 热变性蛋白沉淀 Thermal denaturation protein precipitation ; B : 上清液冻干后的物质 Material lyophilized from supernatant ; B₀ : B 物质不溶于 0.2 mol/L 乙酸的沉淀部分 The 0.2 mol/L HAc-insoluble material of B ; B₁ , B₂ : B 物质中溶于 0.2 mol/L 乙酸的部分经 G25 coarse 脱盐柱层析得到的 2 个组分 Two fractions chromatographed by G25 coarse column from 0.2 mol/L HAc-soluble material of B ; D : 未被海藻酸吸附的酸提取物冻干后的物质 Lyophilized material extracted by acid but un-absorbed by alginic-acid ; C : 海藻酸吸附的多肽洗脱后经盐析得到的干物质 Material salted out from the washed peptide absorbed in alginic-acid ; C₀ : C 物质中不溶于 0.2 mol/L 乙酸的沉淀部分 The 0.2 mol/L HAc-insoluble material of C ; C₁ ~ C₁₁ : C 物质中溶于 0.2 mol/L 乙酸的部分经 G50 柱层析得到的 11 个组分 Eleven fractions chromatographed by G50 column from 0.2 mol/L HAc-soluble material of C. 下同 The same below.

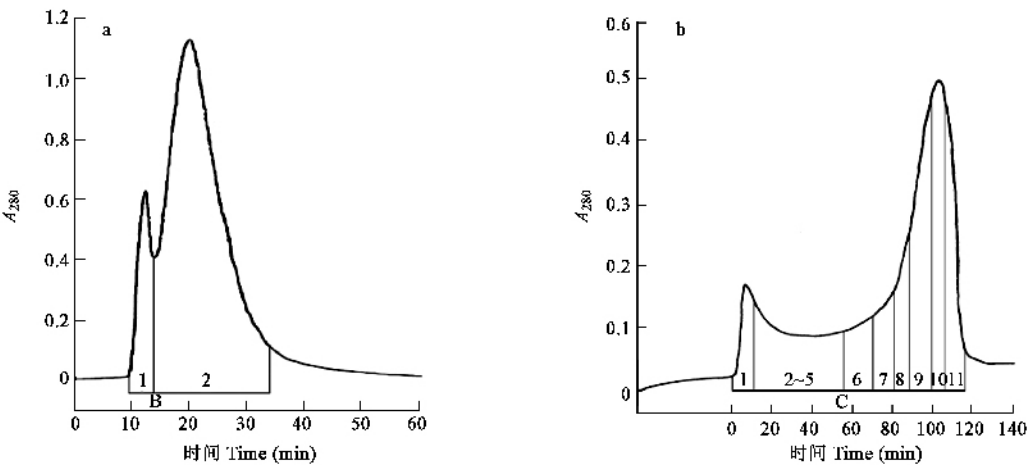


图 2 蝇蛆抗菌肽 B 组分的 Sephadex G25 coarse (a) 和 C 组分的 Sephadex G50 fine (b) 柱层析图
Fig. 2 Chromatograms of fraction B on the gel filtration chromatography on a Sephadex G25 coarse column (a) and fraction C on gel filtration chromatography on a Sephadex G50 fine column (b)

2.2 抗菌活性分布

将各组分的作用终浓度调整为 25 μg/μL ,利用微量液体检测法(陆婕等 ,2006)测定各组分对 4 种供试菌的杀菌效果。结果(表 1)表明 : (1)组分 B₁、B₀ 和 C₀ 对苏云金芽孢杆菌和枯草杆菌有杀菌活性 ,说明凝胶柱的洗脱缓冲液可直接采用 0.5 mol/L 乙酸 ,以减少活性物质的损失 ;(2)热沉淀蛋白 A 没有抗菌活性 ,可见加热能除去不耐热蛋白 ,有利于耐热的抗菌肽的分离提取 ;(3)海藻酸吸附后盐析得到的蛋白组分 C 经 Sephadex G50 fine 柱层析分离得

到 2 个峰 ,与陆婕等(2006)曾使用过的 Sephadex G25 fine 柱相比 ,分离度明显提高。活性组分主要集中在第 2 个峰(即 C₈ ~ C₁₁ 组分) ,层析得到多肽质量共 184.3 mg ,C₁₀ 和 C₁₁ 组分除了能杀灭枯草杆菌和苏云金芽孢杆菌外 ,还能杀灭金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌 ,抗菌活性更强。计算活性肽得率时 ,C_活 = C₁ + C₈ + C₉ + C₁₀ + C₁₁ = 129.0 mg。参照陆婕等(2006)的方法 ,组分 B₁ 经 95℃加热处理 2 h 后仍有抗菌活性 ;此外 ,B₂ 和 D 组分对 4 种细菌均有较强的抗菌活性(结果未显示)。

表 1 从蝇蛆提取的抗菌肽各组分的杀菌效果
Table 1 Antibacterial effect of antibacterial fractions from *Musca domestica* larvae

菌株 Bacteria strains	A	B ₀	B ₁	C ₀	C ₁	C ₂₋₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁
枯草杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

+ : 具有抑菌效果 With antibacterial activity ; - : 没有抑菌效果 Without antibacterial activity.

2.3 电泳结果

采用不同的电泳技术鉴定蝇蛆抗菌肽的分子量及等电点分布 ,控制每孔上样量 20 μg ,经 Tricine-SDS-PAGE 和 IEF-PAGE ,得到分子量回归方程 $Y = 0.0262X + 1.849$ ($r = 0.9942$) ,等电点回归方程 $Y = -0.075X + 9.416$ ($r = 0.9975$)。分析结果如下 : (1)与海藻酸吸附法提取的 C 组分性质相似 ,加热-层析法提取的抗菌肽 B₁ 主要是分子量 6.2 ~ 17.2 kD (图 3 : a) , pI 值 5.59 ~ 5.91 的弱酸性的小肽组分 ,同时存在少量 pI 值约 8.88 的弱碱性蛋白(图 3 : c) ; (2) C 组分中的抗菌肽主要是 pI 值约 5.59 的弱酸性的小肽组分(图 3 : c) ,经 Sephadex G50 柱层析后 ,活性最强的 C₁₀ 和 C₁₁ 中分子量约 6.9 kD 的小肽含量明显增加(图 3 : b) ,该小肽即陆婕等(2006)曾报道过的新抗菌肽 MD₇₀₉₅ ; (3)无活性的热沉淀 A 中只有弱碱性蛋白(图 3 : c) ,进一步说明家蝇中的抗菌肽主要是弱酸性蛋白。有较强抗菌活性的 B₂ 和 D 组分经电泳后 ,均未得到染色的蛋白条带 ,多次实验结果均证明它们是非蛋白类物质(结果未显示)。

2.4 提取工艺分析

按 2 种提取工艺得到的抗菌肽的质量及得率见表 2。活性肽得率计算公式 : 抗菌肽质量(g)原料

质量(g)× 100% 。由表 2 可见加热-层析法的抗菌肽得率为 0.26% ,是海藻酸吸附法提取抗菌肽得率的 5.2 倍 ,这有利于降低生产成本。实际操作中 ,还可通过增加 0.5 mol/L 乙酸浸提时间、次数等工艺改进 ,进一步提高得率。

3 讨论

昆虫是自然界中最大的类群 ,而蝇类又在昆虫家族中占很大比重 ,但长期以来人们仅将其作为一种廉价优质的饲料蛋白资源 ,对其医用价值未深入研究及充分开发和利用(贺继东和夏文水 ,2002 ;王明福等 ,2004)。

蝇类可以产生多种抗菌肽 ,能对多种 G⁺ 菌、G⁻ 菌、真菌和癌细胞有抑制或杀灭作用 ,但目前的工艺研究尚处于实验探索阶段 ,很难进行大规模生产。海藻酸吸附法是瑞典 Karolinska 学院提取小肽的经典方法(陆婕等 ,2006) ,海藻酸可有效地吸附小分子量蛋白 ,在针对小肽的科研中具有重要的作用 ,但其操作过程繁琐 ,不利于抗菌肽产品的大规模生产制备。本研究探索并比较了多种提取工艺 ,综合考虑提取得率、产品稳定性、工艺和成本等因素 ,采用加

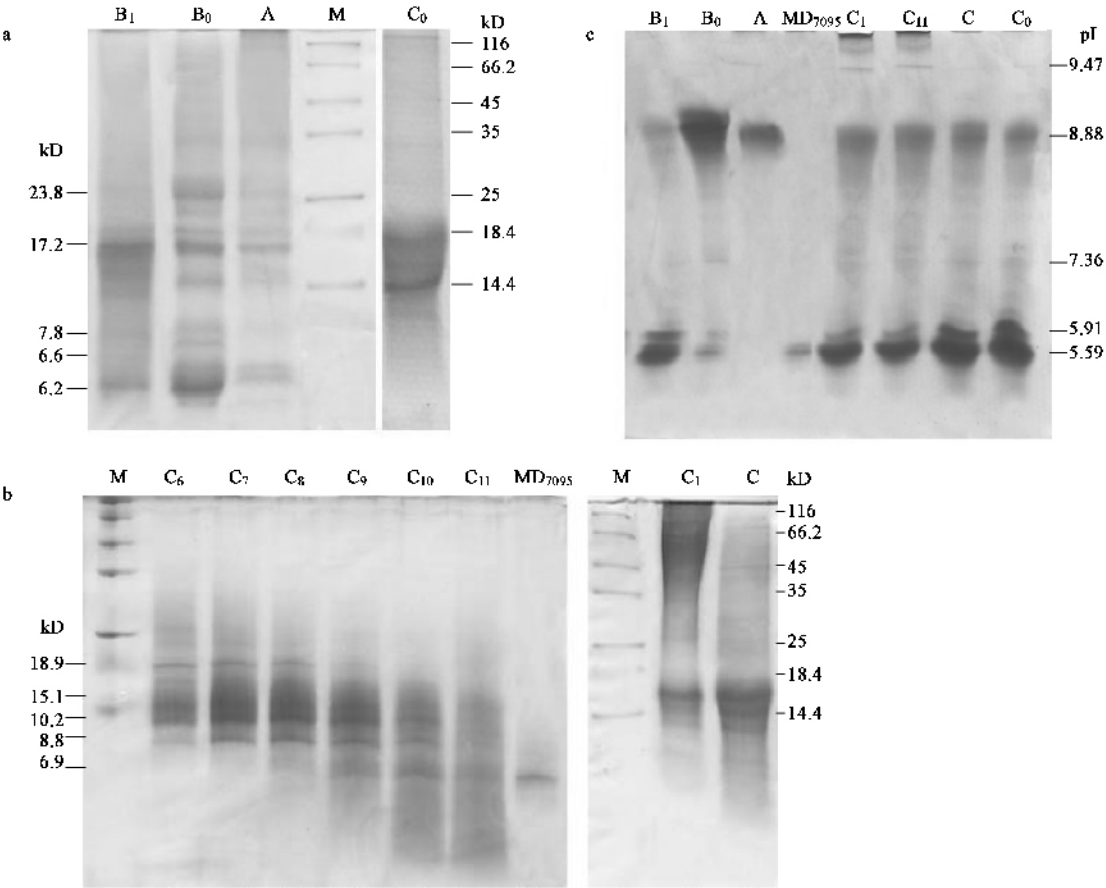


图 3 2 种工艺提取的蝇蛆抗菌肽的电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis of antibacterial peptides extracted from *Musca domestica* larvae by two extraction methods respectively a, b: Tricine-SDS-PAGE. 左 Left lane :通过计算预测的蛋白质分子量 Predicted molecular weight of protein ;右 Right lane :蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker. c : IEF-PAGE. 右 Right lane :通过计算预测的蛋白质等电点 Predicted pI of protein. MD₇₀₉₅ :陆婕等 (2006) 报道的弱酸性抗菌肽 A weak-acid antibacterial peptide reported by Lu *et al.* (2006).

表 2 2 种提取工艺得到的抗菌肽组分的质量及得率

Table 2 Mass and ratio of antibacterial peptides purified by two extraction methods

提取方式 Extraction method	原料质量(g) Crude material mass	抗菌肽质量(g) Antibacterial peptides mass	得率(%) Extraction ratio
加热-层析法 Heat-chromatography	250	0.66	0.26
海藻酸吸附法 Alginate-acid-absorption	250	0.13	0.05

热-层析法提取蝇蛆抗菌物质 ,其抗菌肽得率为 0.26% ,是海藻酸吸附法抗菌肽得率的 5.2 倍。由于抗菌肽对热很稳定 ,在大规模生产中可采用喷雾干燥法 ,从而进一步降低生产成本。

已报道的抗菌肽多为弱碱性 ,纯化过程中多采用弱阳离子交换步骤 ,上样之前需要调节样品溶液与洗脱液的 pH 值平衡 ,但这往往会影响抗菌肽的活性及得率 ,且操作时间长 ,步骤繁琐。等电点检测结果表明 ,本研究中用 0.2 mol/L 乙酸提取的小肽多

为弱酸性 ,采用弱阳离子交换柱分离只能得到一个不挂柱的主峰(陆婕等 ,2006) ,分离效果并不明显 ,故在实际操作中可省去离子交换步骤 ,以减少操作过程对抗菌肽活性和得率的影响。在凝胶填料中 , coarse 型比 fine 型的凝胶粒度粗 ,流速快 ,分离效率高 ,经常用于样品脱盐。根据实验摸索 ,我们直接采用 Sephadex G25 coarse 柱对提取粗品进行层析分离 ,在脱盐的同时 ,还能有效分离蛋白和非蛋白组分 ,大大简化了纯化工艺。

在摸索提取工艺的过程中,我们还将蝇蛆酸提取液直接冻干后进行 Sephadex G25 coarse 柱脱盐层析,结果得到与 B 组分一样的分离效果和活性分布(图略)。虽然加热-层析法提取抗菌肽的得率比直接冻干法抗菌肽的得率稍低,但加热过程能有效去除外源性蛋白酶,避免抗菌肽降解失活,有利于保证产品的质量和稳定性。

蝇类的免疫系统中,除了抗菌肽之外,还可以产生多种抗菌物质,如蝇类几丁糖也具有抗菌活性(雷朝亮等,1998;赖凡等,1998,1999)。本研究中也发现,除了抗菌肽外,利用加热-层析法还能提取到大量的有抗菌活性的非蛋白组分(B_2),该组分深褐色,极易吸潮呈粘稠状,推测其为几丁糖类物质,尚待进一步化学鉴定。在实际生产中,可以将该活性组分开发成为新的抗菌产品,或者与抗菌肽一起使用,通过更多抗菌组分之间的协调作用,达到更好的抗菌效果。

应用基因工程方法生产抗菌肽是一种趋势,但目前还存在不少问题有待深入研究,如:进一步提高表达水平、包涵体复性、活性蛋白回收纯化、避免抗菌肽被内源的蛋白酶水解、提高基因表达产物的稳定性、翻译后修饰对活性的影响等。除了工艺问题外,还由于表达抗菌肽的种类单一而抗菌效果欠佳。我国是农业大国,蝇蛆资源十分丰富,从来源丰富、价格低廉的天然材料中纯化多种抗菌肽很有应用前景。

抗菌肽类产品与化学抗菌剂相比,具有安全、无刺激等优点。本研究探索的加热-层析法提取蝇蛆抗菌肽方法简便,同时还纯化出有抗菌活性的非蛋白组分(疑为几丁糖类物质),提示开发具有高附加值的抗菌产品,如抗菌漱口水、抗菌滴眼液、妇洗液等,还可以添加到面霜、洗面奶、洁肤水、去痘霜等化妆品中作为日常护肤之用,将会有良好的应用价值和市场前景。

参 考 文 献 (References)

An CJ, Geng H, Hao YJ, 2004. The influences of different factors in extraction on antibacterial activity of protein crude extracts in housefly larvae. *Acta Entomol. Sin.*, 47(5): 691–694. [安春菊,耿华,郝友进,2004.不同提取工艺对家蝇幼虫蛋白提取液抗菌活性的影响.昆虫学报 47(5): 691–694]

An CJ, Li DS, Zhao SR, 2005. Optimization of the gel-filtration chromatography parameters for separating proteins from the crude extracts of housefly. *Acta Entomol. Sin.*, 48(1): 139–142. [安春菊,李德森,赵素然,2005.凝胶过滤层析参数对家蝇蛋白粗提液分离效

果的影响.昆虫学报 48(1): 139–142]

An CJ, Li DS, Du RQ, 2004. Analysis of antibacterial-relative proteins and peptides in housefly larvae. *Journal of Hygiene Research*, 33(1): 86–88. [安春菊,李德森,杜荣骞,2004.家蝇幼虫中与抗菌功能相关的蛋白和多肽的分析.卫生研究,33(1): 86–88]

An CJ, Shi M, Hao YJ, 2003. Inducement and activity analysis of antibacterial related proteins/peptides in housefly larvae. *Acta Entomol. Sin.*, 46(5): 545–548. [安春菊,石明,郝友进,2003.家蝇幼虫抗菌相关蛋白多肽的诱导及抗菌活性分析.昆虫学报 46(5): 545–548]

Bai M, Zhou L, 2002. Some structure information and biological activities of an antibacterial protein from *Musca domestica* (house fly). *Journal of Chinese Biochemistry and Molecular Biology*, 18(5): 633–637. [柏鸣,周立,2002.家蝇抗菌蛋白的部分结构信息及生物学活性.中国生物化学与分子生物学报,18(5): 633–637]

Cao XH, Chen Y, Zhang Y, 2003. Isolation and characterization of *Musca domestica* pupae lectin. *Prog. Biochem. Biophys.*, 30(3): 442–446. [曹小红,陈一,张燕,2003.家蝇蛹凝集素的分离工艺和性质的初步研究.生物化学与生物物理进展,30(3): 442–446]

Gong X, Le GW, Shi YH, 2003. Electrophoretic preparation and biologic characterization of antibacterial peptides from *Musca domestica* larvae. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 22(6): 25–38. [宫霞,乐国伟,施用晖,2003.电泳制备家蝇幼虫抗菌肽及其性质.无锡轻工大学学报,22(6): 25–38]

Gong X, Shi YH, Le GW, 2004. Purification of antimicrobial peptide MDL-1 from *Musca domestica* larvae and its effect on *Escherichia coli* ultrastructure. *Acta Entomol. Sin.*, 47(1): 8–13. [宫霞,施用晖,乐国伟,2004.家蝇幼虫抗菌肽 MDL-1 的分离纯化及其对大肠杆菌超微结构的影响.昆虫学报 47(1): 8–13]

Hermann S, von Gebhard J, 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kD. *Analytical Biochemistry*, 166: 368–379.

He JD, Xia WS, 2002. Utilization and processing of engineering *Musca* larva. *Sci. Tech. Food Industry*, 23(12): 90–93. [贺继东,夏文水,2002.工程蝇蛆的开发利用和深度加工.食品工业科技,23(12): 90–93]

Lai F, Lei CL, Niu CY, 1999. The inhibition of housefly larvae chitosan to bacteria. *Journal of Hubei Agricultural College*, 19(4): 337–339. [赖凡,雷朝亮,牛长缨,1999.蝇蛆几丁糖对几种细菌抑制作用的研究.湖北农学院学报,19(4): 337–339]

Lai F, Lei CL, Zhong CZ, 1998. Inhibition of fly-maggot chitin on some plant pathogenic fungi. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 17(2): 122–125. [赖凡,雷朝亮,钟昌珍,1998.蝇蛆几丁糖对几种植物病原真菌的抑制作用.华中农业大学学报,17(2): 122–125]

Lei CL, Wu YY, Niu CY, 1998. Preliminary studies on the antifungal mechanism of chintosan from the housefly larvae. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 17(6): 531–533. [雷朝亮,吴颖运,牛长缨,1998.蝇蛆几丁糖抑菌机理的初步研究.华中农业大学学报,17(6): 531–533]

Liu H, Wan QH, Zhang X, 2004. Extraction and dynamics study on antibacterial protein of house fly larva by inducements. *Chinese Journal*

- of Public Health*, 20(4):427–428. [刘晖, 万启惠, 张曦, 2004. 诱导家蝇幼虫抗菌蛋白的提取及动力学研究. 中国公共卫生, 20(4):427–428]
- Lu J, Wang JH, Zhong Y, 2006. Purification and characterization of weak-acid antibacterial peptide MD₇₀₉₅ from *Musca domestica* larvae. *Acta Microbiol. Sin.* 46(3):406–411. [陆婕, 汪俊汉, 钟雅, 2006. 弱酸性家蝇蛆抗菌肽 MD₇₀₉₅ 的分离纯化及性质研究. 微生物学报 46(3):406–411]
- Luo JX, Yang CL, Wu WD, 2005. Study and application of *Musca domestica* antimicrobial peptides. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(3):235–239. [罗金香, 杨春龙, 吴伟东, 2005. 家蝇抗菌肽的研究与应用. 昆虫知识 42(3):235–239]
- Rao JH, Zhou YF, Yang JC, 1999. Studies on properties of immunized hemolymph of *Musca domestica* L. *Natural Enemies of Insects*, 21(3):121–125. [饶军华, 周永富, 阳建春, 1999. 家蝇免疫血淋巴的性质研究. 昆虫天敌 21(3):121–125.]
- Sheng CZ, An CJ, Geng H, 2002. Separation and purification of a heat-stable antibacterial peptide of the larvae of housefly. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 35(4):6–10. [盛长忠, 安春菊, 耿华, 2002. 一种家蝇幼虫热稳定抗菌肽的分离纯化. 南开大学学报(自然科学版) 35(4):6–10]
- Wang JZ, Fan M, 2002. Technical Manual for Protein Research. Beijing: China Sciencetech Press. 77–134. [汪家政, 范明, 2002. 蛋白质技术手册. 北京: 科学技术出版社. 77–134]
- Wang MF, Tong YF, Xue WQ, 2004. Forecast of the flies resources and utilization. *Resources Science*, 26(5):153–159. [王明福, 佟艳丰, 薛万琦, 2004. 蝇类资源及其利用前景展望. 资源科学 26(5):153–159]
- Wang YC, Zuo XF, Sun DX, 1997. The assay of composition and physicochemical characteristics of antibacterial matters from house fly larvae. *Acta Microbiol. Sin.*, 37(2):148–153. [王远程, 左晓峰, 孙东旭, 1997. 家蝇幼虫抗菌物质组成及其理化性质. 微生物学报 37(2):148–153]
- Zhao RJ, Liu CF, Dong JZ, 2005. Extraction and isolation of antimicrobial peptides from *Musca domestica*. *Journal of Tropical Medicine*, 5(2):193–194. [赵瑞君, 刘成芳, 董建臻, 2005. 家蝇抗菌肽的诱导提取及筛选. 热带医学杂志 5(2):193–194]
- Zhou YF, Rao JH, Yang JC, 1997. Induction of antibacterial substance of *Musca domestica* L. *Biology Magazine*, 14(3):23–26. [周永富, 饶军华, 阳建春, 1997. 家蝇抗菌物质的诱导. 生物学杂志 14(3):23–26]

(责任编辑: 黄玲巧)